

低分子量有机酸对氧化亚铁硫杆菌影响

任婉侠^{1,2} 李培军^{1*} 范淑秀^{1,2} 何娜^{1,2}

(1. 中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳 110016; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要 氧化亚铁硫杆菌生物淋滤修复重金属污染土壤研究报道很少, 因为该菌对低分子量有机酸敏感。研究6种低分子量有机酸(甲酸、乙酸、丙酸、草酸、苹果酸和柠檬酸)对嗜酸性氧化亚铁硫杆菌 R2 氧化 Fe^{2+} 的影响, 且利用高效液相色谱法测定沈阳冶炼厂和张士灌区重金属污染土壤中低分子量有机酸的浓度。结果表明, 6种有机酸对 R2 氧化能力均具有抑制作用, 且抑制顺序为: 甲酸 > 乙酸 > 丙酸 > 草酸 > 苹果酸 > 柠檬酸。其中 R2 对甲酸最敏感, 甲酸浓度为 0.064 mmol/L 时, 抑制率达到 60%; 浓度为 0.254 mmol/L 时, R2 氧化 Fe^{2+} 的能力完全被抑制。液相色谱分析可知, 冶炼厂和张士灌区土壤中有机酸的浓度很低, 其中草酸含量最高, 分别为 0.04 和 0.149 mmol/L。尽管氧化亚铁硫杆菌对低分子量有机酸很敏感, 但是试验土壤中低分子量有机酸的浓度远远低于硫杆菌的耐受限度。因此, 分离菌株 R2 有望应用于重金属污染土壤的修复。

关键词 嗜酸性氧化亚铁硫杆菌 生物淋滤修复 重金属污染土壤 低分子量有机酸

中图分类号 X53 文献标识码 A 文章编号 1673-9108(2008)09-1269-05

Effects of low molecular weight organic acids on *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Ren Wanxia^{1,2} Li Peijun¹ Fan Shuxiu^{1,2} He Na^{1,2}

(1 Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016;

2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

Abstract A little work has been reported concerning bioleaching of heavy-metal contaminated soil using *Acidithiobacillus ferrooxidans*, since this acidophile is sensitive to low molecular weight (LMW) organic acids. Effects of LMW organic acids (formic, acetic, propionic, citric, malic and oxalic acids) on Fe^{2+} oxidation by *A. ferrooxidans* R2 were examined, and the concentrations of LMW organic acids in soils (from Shenyang Smelter and Zhangshi irrigation area) were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). Iron oxidation by R2 was inhibited by a variety of LMW organic acids. Growth experiments with ferrous iron as an oxidant showed that the inhibition capability sequence was formic acid > acetic acid > propionic acid > oxalic acid > malic acid > citric acid. Formic acid was the most toxic that the inhibition rate was up to 60% at the concentration of 0.064 mmol/L and the oxidation ability of R2 was entirely inhibited at the concentration of 0.254 mmol/L. HPLC analyses showed that the highest concentrations of LMW organic acids in the soils were 0.04 mmol/L and 0.149 mmol/L oxalic acid, respectively. Although R2 was sensitive to organic acids, the concentrations of LMW organic acids in the contaminated soils were rather lower than the tolerable levels. Hence, it is feasible that R2 might be used for bioleaching of heavy metal-contaminated soils.

Key words *Acidithiobacillus ferrooxidans*; bioleaching; contaminated soil with heavy metal; low molecular weight organic acid

生物淋滤(bioleaching)技术是利用微生物的直接作用或其代谢产物的间接作用, 产生氧化、还原、络合、吸附或溶解作用, 将固相中某些不溶性成分分离浸提出来的一种技术^[1]。与化学浸提法相比, 它具有反应温和、耗酸少、运行成本较低等优点, 已成为一项非常有前景的金属浸提技术^[1-3]。已在污泥^[4-9]、沉积物^[10-13]和飞灰^[2]等方面得到研究, 但

基金项目: 国家“863”高技术研究发展计划项目(2007AA061101); 国家“973”重点基础研究发展规划项目(2004CB418506); 国家环保局“全国土壤现状研究调查及污染防治专项”资助项目; 中国科学院知识创新工程重大项目(kzcx1-yw-06-03)

收稿日期: 2008-01-26; **修订日期:** 2008-04-05

作者简介: 任婉侠(1977~), 女, 博士研究生, 主要从事重金属污染土壤的微生物修复技术的研究工作。

E-mail: ren_laura@163.com

* 通讯联系人, E-mail: lipeijun@iae.ac.cn

在金属污染土壤中的研究很少^[14-16],因为氧化亚铁硫杆菌对低分子量溶解性有机酸特别敏感^[17]。Zagury 等^[18]认为,某些硫化杆菌可以耐受有机质毒性,但是关于重金属污染土壤中分离的氧化亚铁硫杆菌的研究少有报道。本文作者研究了氧化亚铁硫杆菌 R2 对低分子量有机酸的敏感性,测定土壤中有机酸含量,以确定该菌在土壤修复中应用的可能性,为生物淋滤修复试验提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试土壤

采自沈阳冶炼厂和张士灌区重金属污染土壤,其基本理化性质如表 1 所示。

表 1 供试土壤基本性质
Table 1 Physico-chemical characteristics
of the contaminated soils

参 数	沈阳冶炼厂	张士灌区
pH*	7.8	6.1
有机质 (%)	3.42	3.32
总氮 (%)	0.064	0.15
总钾 (mg/kg)	14 150	18 020
钙 (mg/kg)	26 606	12 056
镁 (mg/kg)	1 357	4 818
铜 (mg/kg)	1 100	106
锌 (mg/kg)	7 760	492
镉 (mg/kg)	105	9.86
铅 (mg/kg)	21 138	113

* 土壤:水 = 1:2.5

1.1.2 菌种来源

用于低分子量有机酸影响试验的嗜酸性化能自养型硫杆菌为本实验室分离出的氧化亚铁硫杆菌 R2。

1.1.3 培养基

改进型 Leathen 液体培养基:

A 液:(NH_4)₂SO₄ 0.45 g; KCl 0.05 g; K₂HPO₄ 0.15 g; MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g; Ca(NO₃)₂ 0.01 g; 蒸馏水 700 mL; 5 mol/L H₂SO₄ 调节 pH = 2.0。

B 液: FeSO₄ · 7H₂O 20 g, 蒸馏水 300 mL。

A 溶液 121℃ 高压灭菌 15 min, B 溶液微孔滤膜 (ϕ 0.22 μ m) 真空抽滤除菌。

1.1.4 试 剂

苹果酸 (德国 Merck 公司产品, 优级纯, G. R.), 甲酸 (天津市科密欧化学试剂公司, 液相色谱纯); 乙酸、丙酸、草酸和酒石酸 (辽宁省沈阳市试剂一厂, G. R.); (NH_4)₂HPO₄ 和 H₃PO₄ (天津市科密

欧化学试剂公司, G. R.); 有机酸储液 (1 g/L); 超纯水 (EASYpure RF, Barnstead, 美国)。

1.1.5 仪 器

显微镜 (Olympus BH-2, 日本), 扫描电镜 (JSM-T300, JEDL, 日本), 液相色谱仪 (安捷伦高效液相色谱仪, Agilent 1100, 美国), TOC 检测仪 (Multi N/C, 3000), 冷冻干燥机 (FD-1C-50, 北京博医康实验仪器有限公司), 摇床 (HDL, HZQ-C, 哈尔滨)。

1.2 方 法

1.2.1 低分子量有机酸对氧化亚铁硫杆菌氧化 Fe²⁺ 影响

取灭菌后的改进型 Leathen 培养基 85 mL 放入 250 mL 锥形瓶中, 接入活化 3 次的 R2 菌液, 接种量 15% (体积百分比), 然后加入不同浓度的过 0.22 μ m 滤膜除菌的有机酸溶液, 150 r/min, 30℃ 培养, 每隔 24 h 取样 0.5 mL, 采用 1, 10-邻菲罗琳法和分光光度法 (见土壤农化分析) 分析培养溶液中 Fe²⁺ 的浓度, 蒸发损失的液体用蒸馏水补充。

试验有机酸的浓度依次为 (mmol/L): 甲酸 (0, 0.064, 0.127, 0.254, 0.3184), 乙酸 (0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 2.0), 丙酸 (0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 2.0), 草酸 (0, 0.4, 0.8, 2.0, 10), 苹果酸 (0, 6.0, 10, 20, 40), 柠檬酸 (0, 10, 20, 40, 80)。空白对照不加各种有机酸, 以同体积的无菌水代替。

1.2.2 土壤中溶解性有机质提取与测定

土壤中溶解性有机质 (dissolved organic matter, DOM) 的提取步骤见文献 [19]。DOM 溶液经冷冻干燥浓缩后储存于 -20℃ 冰箱中。由 TOC 检测仪测定适当稀释后的 DOM 溶液, 经计算知: 冶炼厂土壤和张士灌区土壤中 DOM 的浓度分别为 24.22 mg DOC/kg and 189.12 mg DOC/kg。

1.2.3 HPLC 分离条件

液相色谱分离条件: Zobax C18, 250 mm × 4.6 mm; 流动相: 5 g/L (NH_4)₂HPO₄-H₃PO₄ (pH 2.5); 流速: 0.6 mL/min; 温度: 35℃; 进样量: 10 μ L; 检测器: diode array detector (DAD); 波长: 215 nm。所有样品进样前必须过 0.22 μ m 滤膜。

1.2.4 土壤中有有机酸测定

采用 2 种方法对土壤中有有机酸组分定性: 在相同条件下, 将样品色谱图与有机酸标准液色谱图进行对照, 根据保留时间确定样品中的有机酸; 在样品中加入有机酸的标准溶液 (100 μ g/mL), 根据峰高

的突增进一步验证色谱峰的归属。

土壤中有机的浓度很低,本试验采用增强型积分法,测量峰面积,按外标法定量。

2 结果与讨论

2.1 甲酸、乙酸和丙酸对 R2 氧化 Fe^{2+} 影响

图 1(a)、(b)和(c)分别表明甲酸、乙酸和丙酸对 R2 氧化 Fe^{2+} 的抑制作用。

从图 1 可知,未加有机酸的空白样经过 24 h 左右时间,溶液中的 Fe^{2+} 几乎完全被氧化,表明菌株 R2 生长快速。在 3 种有机酸中,甲酸对 R2 氧化性的抑制力最强,当甲酸浓度仅为 0.064 mmol/L 时,24 h 左右时抑制率达到 60%;当浓度为 0.127 mmol/L 时,与空白样相比完全氧化时间延迟 4 d;而当其浓度升高到 0.254 mmol/L 时, Fe^{2+} 的氧化则完全被抑制。Tuttle 等^[20]的研究也表明,在简单有机酸中,氧化亚铁硫杆菌对甲酸的敏感性最强,

当甲酸的浓度分别为 1 mmol/L 和 10 mmol/L 时,抑制率分别达到 98% 和 100%。Gu 等^[21]的研究也表明,甲酸的毒性最强,当其浓度为 0.08 mmol/L 时, *A. ferrooxidans* 氧化 Fe^{2+} 的能力完全被抑制。从图 1(b)和(c)可知,在添加了 0.1 mmol/L 乙酸和丙酸的培养基中 R2 展现了较好的氧化能力。而且有试验表明,当培养基中添加适量乙酸和丙酸时,可以轻微刺激 R2 氧化 Fe^{2+} 的能力。当添加的乙酸和丙酸的浓度在 0.2 ~ 0.8 mmol/L 范围内时,与丙酸相比乙酸显示了更强的抑制能力。与空白相比,0.8 mmol/L 的乙酸和丙酸的加入,使 Fe^{2+} 完全氧化时间各自推后 7 d 和 6 d。从图中可以得出甲酸、乙酸和丙酸对 R2 的毒性顺序为:甲酸 > 乙酸 > 丙酸。

2.2 苹果酸、草酸和柠檬酸对 R2 氧化 Fe^{2+} 影响

苹果酸、草酸和柠檬酸对 R2 氧化能力的影响结果如图 2(a)、(b)和(c)所示。

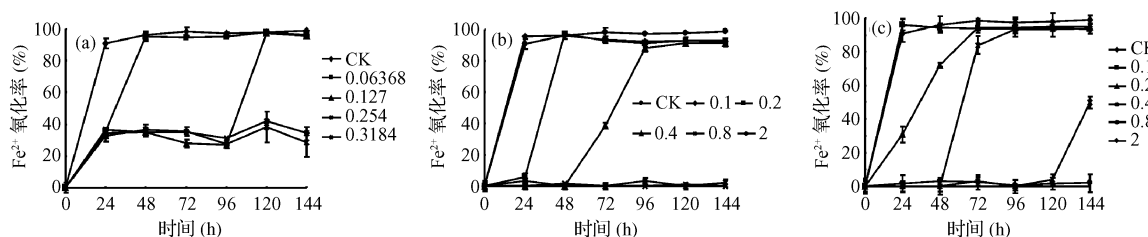


图 1 不同浓度的甲酸(a)、乙酸(b)和丙酸(c)对 R2 氧化 Fe^{2+} 影响

Fig. 1 Effects of different concentrations of formic (a), acetic (b) and propionic acid (c) on Fe^{2+} oxidation of R2

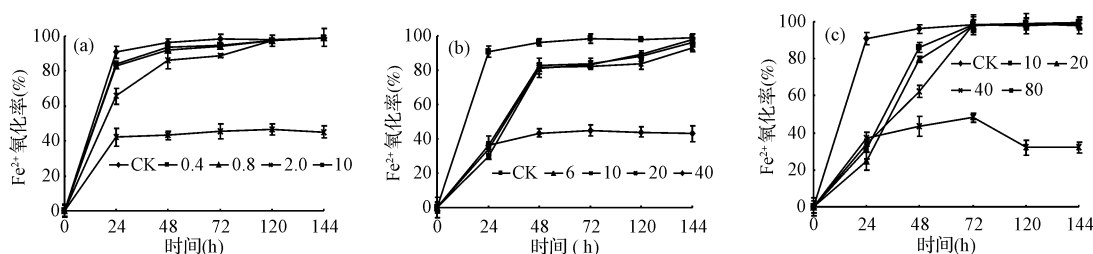


图 2 不同浓度的苹果酸(a)、草酸(b)和柠檬酸(c)对 R2 氧化 Fe^{2+} 影响

Fig. 2 Effects of different concentrations of malic (a), oxalic (b) and citric acid (c) on Fe^{2+} oxidation of R2

从图 2 可知,在这 3 种有机酸中,草酸对 R2 生长的毒性最强。当其浓度为 10 mmol/L 时,R2 氧化 Fe^{2+} 的能力完全被抑制,但是 R2 却可以在添加了 20 mmol/L 苹果酸和 40 mmol/L 柠檬酸的培养基中展现了氧化活性,虽然其完全氧化 Fe^{2+} 的时间分别推后了 5 d 和 2 d。在 24 h 的培养时间内,0.4 mmol/L 和 2.0 mmol/L 草酸抑制率分别为 6%

和 60%;6 ~ 20 mmol/L 苹果酸抑制率达到 55%;10 ~ 40 mmol/L 柠檬酸抑制率为 60%。从图中可知,苹果酸、草酸和柠檬酸对 R2 氧化 Fe^{2+} 的毒性大小顺序为:草酸 > 苹果酸 > 柠檬酸。

2.3 HPLC 测定土壤中低分子量有机酸

2.3.1 标准曲线及检测限

根据前述试验步骤和条件,将混合标准系列溶

液依次等体积进样,分别得到6种有机酸组分的工作曲线,并以信噪比为3确定检测限,结果如表2所示。

表2 有机酸的标准曲线
Table 2 Calibration of organic acids

有机酸	相关系数(<i>r</i>)	检测限(LOD)($\mu\text{g/mL}$)	保留时间(min)
甲酸	0.9954	1.0	6.587
乙酸	0.9991	0.2	10.104
柠檬酸	1	0.2	12.755
草酸	0.9992	0.00075	5.358
苹果酸	0.999	0.1	7.495
酒石酸	0.9984	0.1	6.018

2.3.2 土壤 DOM 溶液样品中有机酸的定量分析结果

取冷冻干燥仪浓缩处理的土壤 DOM 溶液,在上述分离条件下进行色谱分析,结果如表3所示。

表3 土壤中低分子量有机酸的浓度
Table 3 Concentrations of LMW dissolved organic acids in the sample soils

	土壤中 LMW 有机酸浓度 ($\times 10^{-4}$ mmol/L)					
	甲酸	乙酸	柠檬酸	草酸	苹果酸	酒石酸
冶炼厂	18.37	0.49	4.4	400	19.85	13.86
张士灌区	未测到	135	9.8	1 490	59	未测到

结果表明:沈阳冶炼厂污染土壤中低分子量有机酸浓度与张士灌区 Cd 污染土壤相比很低;2种土壤样品中草酸的含量最高,分别达到了0.04 mol/L和0.149 mmol/L;但是在前面的毒性试验中,菌株 R2 可以在0.064 mmol/L 甲酸、0.2 mmol/L 乙酸和丙酸、2 mmol/L 草酸、20 mmol/L 苹果酸和40 mmol/L 柠檬酸中具有较好的氧化能力。测定结果表明,冶炼厂土壤中低分子量有机酸的浓度与之相比很低,因此本试验中分离筛选的嗜酸性氧化亚铁硫杆菌 R2 可以应用于此种重金属污染土壤的微生物修复;而张士灌区土壤中有机酸的浓度与冶炼厂土壤相比较,因此菌株 R2 有望应用于此类农田污染土壤的修复。

3 结 论

(1)6种试验低分子量有机酸中,R2对甲酸的敏感性最强。在24 h内当浓度仅为0.254 mmol/L时,R2的氧化能力完全被抑制。根据6种有机酸抑制浓度大小抑制顺序为:甲酸>乙酸>丙酸>草酸>苹果酸>柠檬酸;

(2)HPLC法测定土壤中低分子量有机酸试验

结果表明:沈阳冶炼厂和张士灌区土壤中草酸浓度最高,分别达到0.04 mol/L和0.149 mmol/L,冶炼厂土壤中有有机酸的含量明显低于张士灌区土壤。并且2种土壤中低分子量有机酸浓度远远低于氧化亚铁硫杆菌耐受浓度。因此,氧化亚铁硫杆菌 R2 有望应用于重金属污染土壤的修复。

参 考 文 献

- [1] Krebs W., Brombacher C., Bosshard P. P., et al. Microbial recovery of metals from solids. FEMS Microbil. Rev., **1997**, 20(3~4): 605~617
- [2] Brombacher C., Bachofen R., Brandl H. Development of laboratory-scale leaching plant for metal extraction from fly ash by *Thiobacillus* strains. Appl. Environ. Microbiol., **1998**, 64: 1237~1241
- [3] Xu T. J., Ting Y. P. Optimisation on bioleaching of incinerator fly ash by *Aspergillus niger*: Use of central composite design. Enzyme Microbial. Technol., **2004**, 35: 444~454
- [4] Couillard D., Chartier M., Mercier G. Bacterial leaching of heavy metals from aerobic sludge. Biores. Technol., **1991**, 36: 293~302
- [5] Kim I. S., Lee J. U., Jang A. Bioleaching of heavy metals from dewatered sludge by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Chem. Technol. Biotechnol., **2005**, 80: 1339~1348
- [6] 王世梅,周立祥,黄峰源. 酵母菌与两种硫杆菌复合对污泥中三价铬的去除. 中国环境科学, **2006**, 26(2): 197~200
- [7] Solisio C., Lodi A., Veglio F. Bioleaching of zinc and aluminium from industrial waste sludges by means of *Thiobacillus ferrooxidans*. Waste Management, **2002**, 22: 667~675
- [8] Wong J. W. C., Xiang L., Gu X. Y., et al. Bioleaching of heavy metals from anaerobically digested sewage sludge using FeS_2 as an energy source. Chemosphere, **2004**, 55: 101~107
- [9] 周立祥,方迪,周顺桂,等. 利用嗜酸性硫杆菌去除制革污泥中铬的研究. 环境科学, **2004**, 25(1): 62~65
- [10] Chartier M., Couillard D. Biological processes: The effects of initial pH, percentage inoculum and nutrient enrichment on the solubilization of sediment bound metals. Water Air Soil Pollut., **1997**, 96: 249~267
- [11] Chen S. Y., Lin J. G. Influence of solid content on bioleaching of heavy metals from contaminated sediment by *Thiobacillus* spp. Chem. Technol. Biotechnol., **2000**, 75: 649~656

- [12] Chen S. Y. , Lin J. G. Effect of substrate concentration on bioleaching of metal-contaminated sediment. J. Hazard. Mater. , **2001** , 82 : 77 ~ 89
- [13] Seidel H. , Görsch K. , Schümichen A. Effect of oxygen limitation on solid-bed bioleaching of heavy metals from contaminated sediments. Chemosphere , **2006** , 65 : 102 ~ 109
- [14] Bosecker K. Microbial leaching in environmental clean-up programmes. Hydrometallurgy , **2001** , 59 : 245 ~ 248
- [15] Gomez C. , Bosecker K. Leaching heavy metals from contaminated soil by using *Thiobacillus ferrooxidans* or *Thiobacillus thiooxidans*. Gemicrobiol. J. , **1999** , 16 (3) : 233 ~ 244
- [16] Liu H. L. , Teng C. H. , Cheng Y. C. A semiempirical model for bacterial growth and bioleaching of *Acidithiobacillus* spp. Chem. Eng. J. , **2004** , 99 (1) : 77 ~ 87
- [17] Tuovinen O. H. , Niemela S. I. , Gyllenberg H. G. Effects of mineral nutrients and organic substances on the development of *Thiobacillus ferrooxidans*. Biotechnol. Bioeng. , **1971** , 13 : 517 ~ 527
- [18] Zagury G. J. , Subba N. K. , Tyagi R. D. Adaptation of indigenous iron-oxidizing bacteria for bioleaching of heavy metals in contaminated soils. Environ. Technol. , **1994** , 15 (6) : 517 ~ 530
- [19] Ling W. T. , Xu J. M. , Gao Y. Z. Dissolved organic matter enhances the sorption of atrazine by soil. Biol. Fertil. Soils , **2006** , 42 (5) : 418 ~ 425
- [20] Tuttle J. H. , Dugan P. R. Inhibition of growth, and sulfur oxidation in *Thiobacillus ferrooxidans* by simple organic compounds. Can. J. Microbiol. , **1976** , 22 : 719 ~ 730
- [21] Gu X. Y. , Wong J. W. C. Identification of inhibitory substances affecting bioleaching of heavy metals from anaerobically digested sewage sludge. Environ. Sci. Technol. , **2004** , 38 (10) : 2934 ~ 2939

2008 年度“奥加诺(水质与水环境)奖学金”征集公告

由中国科学院生态环境研究中心主办、日本奥加诺株式会社(ORGANO CORP.)和奥加诺(苏州)水处理有限公司赞助的面向全国研究生的第二届暨 2008 年度“奥加诺(水质与水环境)奖学金”征集工作已经开始,欢迎全国高等院校和科学研究机构在读或 2008 年应届毕业的水环境保护及水处理相关专业博士研究生与硕士研究生报名参选。

本奖励将设立:一等奖 2 名,奖金各 10 000 元;二等奖 8 名,奖金各 5 000 元;三等奖 20 名,奖金各 2 000 元。最终评审会将于 2008 年 10 月底至 11 月初召开,具体会期与地点另行通知。

本奖励的主要研究范围包括:

污水和废水处理与循环利用

饮用水安全保障

水质分析与评价

天然水体和地下水污染控制与修复

其他与水质和水环境保护相关的科学与技术研究

详情请登陆中国科学院生态环境研究中心网站(www.rcees.ac.cn),在网站下载区“人事教育处”下载并按要求填写《奥加诺奖学金申请书》(中英文各一份),在 2008 年 8 月 31 日之前发送至评审办公室的电子信箱:organowaterprize@rcees.ac.cn。

奥加诺奖学金评审办公室

二〇〇八年六月三十日